

【氏名又は名称原語表記】 S m i t h K l i n e B e e c h a m p. l. c.

【住所又は居所】イギリス国 ティダブリュ 8 9 ジーエス, ミドルセックス, プレントフォード, グレート ウェスト ロード 9 8 0

(72) 【発明者】

【氏名】アナ・マリア・バルデス

【住所又は居所】イギリス、シーエム 1 9 ・ 5 エイダブリュー、エセックス、ハーロウ、サード・アベニュー、ニュー・フロンティアーズ・サイエンス・パーク・サウス、グラクソスミスクライン

(72) 【発明者】

【氏名】ピーター・ヘンドリック・エーフェルト・フロート

【住所又は居所】イギリス、シーエム 1 9 ・ 5 エイダブリュー、エセックス、ハーロウ、サード・アベニュー、ニュー・フロンティアーズ・サイエンス・パーク・サウス、グラクソスミスクライン

(72) 【発明者】

【氏名】ナイジェル・ケイ・スパー

【住所又は居所】アメリカ合衆国 2 7 7 0 9 ノースカロライナ州リサーチ・トライアングル・パーク、ファイブ・ムーア・ドライブ、グラクソスミスクライン

(74) 【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】青山 葆 (外 2 名)

【テーマコード (参考)】

2G0454B0244B0634C0844H045

【Fターム (参考)】

2G045 AA25 AA40 DA36 4B024 AA01 AA11 CA04 HA14 HA17 4B063 QA07 QA19 QQ03 QQ43 QS34
4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 CA53 DC50 MA28 MA37 MA52 MA56 MA63 MA66 NA10 ZA452
4H045 AA30 BA10 CA40 DA50 EA23 EA50

(57) 【要約】

本発明は、ヒトの C C R 2 レセプター (C C R 2 - 6 4 V)、特にヒト C C R 2 レセプターの多型変種形態 (C C R 2 - 6 4 I)、およびアテローム性動脈硬化症の発病における危険因子としてのその関与に関する。変種 C C R 2 ポリヌクレオチドおよびポリペプチドが、アテローム性動脈硬化症の発病に関するスクリーニングおよび診断法を含む、それらの使用のための方法と共に提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 対象における配列番号 2 の C C R 2 - 6 4 I ポリペプチドまたは配列番号 4 の C C R 2 - 6 4 V ポリペプチドの発現または活性に関連する、対象のアテローム性動脈硬化症またはアテローム性動脈硬化症への罹りやすさを診断するための方法であって、(a) 該対象のゲノムにおける、C C R 2 レセプターをコードしているポリヌクレオチドのコドン 6 4 にての S N P の存在または不在を測定すること、ここで、該 S N P は配列番号 2 の C C R 2 - 6 4 I ポリペプチドの産生を生じる、および／または、(b) 該対象由来のサンプル中の配列番号 2 の C C R 2 - 6 4 I ポリペプチド、または配列番号 4 の C C R 2 - 6 4 V ポリペプチドの存在または量を分析すること、を含む方法。

【請求項 2】 ポリヌクレオチドのコドン 6 4 にての S N P がヌクレオチド 1 9 0 における G から A への置

換である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 3】 個体における a) アテローム性動脈硬化症の発病の可能性を予測する；

b) アテローム性動脈硬化性の症状の進行を予測し、それに対処する；

c) 薬物治療に対する反応を予測し、それに対処する；または、d) 疾患の結果を予測する：ための、配列番号 3 および配列番号 1 のポリヌクレオチドの存在または不在をアッセイする方法の使用。

【請求項 4】 薬物治療に対する反応が、アテローム性動脈硬化症の治療に有用な治療用化合物に対する逆の事象である、請求項 3 記載の使用。

【請求項 5】 アテローム性動脈硬化症の治療に有用な可能性のある治療用化合物に関する臨床試験を行うための、患者群の選択のための配列番号 3 および配列番号 1 のポリヌクレオチドの存在または不在をアッセイする方法の使用。

【請求項 6】 (a) C C R 2 - 6 4 V ポリペプチドまたはそのフラグメント；

(b) C C R 2 - 6 4 I ポリペプチドまたはそのフラグメント；

(c) C C R 2 - 6 4 V ポリペプチドの活性を阻害する化合物；

(c) C C R 2 - 6 4 V ポリペプチドの二量化を阻害する化合物；

(d) C C R 2 - 6 4 V ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド；

(e) C C R 2 - 6 4 I ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド：から選択される化合物の、(i) アテローム性動脈硬化症；または、(i i) 高コレステロール血症を治療するための医薬の製造のための使用。

【請求項 7】 医薬がアテローム性動脈硬化症の治療に用いられるものである、請求項 6 記載の使用。

【請求項 8】 医薬が、配列番号 4 の C C R 2 - 6 4 V ポリペプチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するポリペプチドを含む単離ポリペプチドを含む、請求項 6 記載の使用。

【請求項 9】 医薬が、配列番号 2 の C C R 2 - 6 4 I ポリペプチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するポリペプチドを含む単離ポリペプチドを含む、請求項 6 記載の使用。

【請求項 1 0】 単離ポリペプチドが配列番号 4 の C C R 2 - 6 4 V ポリペプチドである、請求項 8 記載の使用。

【請求項 1 1】 単離ポリペプチドが配列番号 2 の C C R 2 - 6 4 I ポリペプチドである、請求項 9 記載の使用。

【請求項 1 2】 医薬が、C C R 2 - 6 4 V ポリペプチドの溶解形態を含む、請求項 6 記載の使用。

【請求項 1 3】 医薬が配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含む、請求項 6 記載の使用。

【請求項 1 4】 ポリヌクレオチドが配列番号 1 のポリヌクレオチドと少なくとも 9 5 % の同一性を有するポリヌクレオチドを含む、請求項 1 3 記載の使用。

【請求項 1 5】 ポリヌクレオチドが配列番号 1 のポリヌクレオチド配列を有する、請求項 1 4 記載の使用。

書誌

(19)【発行国】日本国特許庁 (J P)

(12)【公報種別】公表特許公報 (A)

(11)【公表番号】特表 2 0 0 3 - 5 2 3 7 6 3 (P 2 0 0 3 - 5 2 3 7 6 3 A)

(43)【公表日】平成 1 5 年 8 月 1 2 日 (2 0 0 3 . 8 . 1 2)

(54)【発明の名称】C C R 2 - 6 4 I、ヒト C C R 2 レセプターの多型変種およびアテローム性動脈硬化

(51) 【国際特許分類第7版】

A61K 45/00		48/00		A61P 9/10
C12Q 1/68	A	G01N 33/15	Z	33/50 ZNA Z
C07K 14/705		C12N 15/00	A	A61K 37/02

【全頁数】 35

(33) 【優先権主張国】 イギリス (GB)

(71) 【出願人】

【住所又は居所】イギリス国 ティダブリュ 8 9 ジーエス, ミドルセックス, プレントフォード, グレート ウェスト ロード 980

【住所又は居所】 イギリス、シーエム19・5エイダブリュー、エセックス、ハーロウ、サード・アベニ

ュー、ニュー・フロンティアーズ・サイエンス・パーク・サウス、グラクソスミスクライン

(72)【発明者】

【氏名】ピーター・ヘンドリック・エーフェルト・フロート

【住所又は居所】イギリス、シーエム19・5エイダブリュー、エセックス、ハーロウ、サード・アベニュー、ニュー・フロンティアーズ・サイエンス・パーク・サウス、グラクソスミスクライン

(72)【発明者】

【氏名】ナイジェル・ケイ・スパー

【住所又は居所】アメリカ合衆国27709ノースカロライナ州リサーチ・トライアングル・パーク、ファイブ・ムーア・ドライブ、グラクソスミスクライン

(74)【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】青山 葆（外2名）

【テーマコード（参考）】

2G0454B0244B0634C0844H045

【Fターム（参考）】

2G045 AA25 AA40 DA36 4B024 AA01 AA11 CA04 HA14 HA17 4B063 QA07 QA19 QQ03 QQ43 QS34
4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 CA53 DC50 MA28 MA37 MA52 MA56 MA63 MA66 NA10 ZA452
4H045 AA30 BA10 CA40 DA50 EA23 EA50

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、ヒトCCR2レセプター、特にヒトCCR2レセプターの多型変種形態、およびアテローム性動脈硬化症の発病における危険因子としてのその関与に関する。

【0002】

アテローム性プラークの破裂のおよびその結果である冠動脈内血栓は、ほとんどの急性冠動脈症候群、例えば不安定狭心症、心筋梗塞、ならびに突然心臓死に関する多くの症例などの原因であると考えられている。これらの急性冠動脈症候群は先進国における全罹病率および死亡率の主要原因を示す。アテローム性動脈硬化疾患のための現在の主な治療法は、積極的に血漿コレステロールを下げることであり、HMG-C o Aレダクターゼインヒビター、スタチンの使用が主である。概して、心血管障害の患者の50%は高コレステロール血症である。

【0003】

しかし多くの場合、そのような治療の有効性は、例えば疾患の診断の遅れによりかなり損なわれる可能性がある。つまり、患者は治療開始前にはすでにアテローム性プラークを進行させており、良好な治療効果の見通しが下がる可能性がある。さらに、初期の診断により、アテローム性動脈硬化症の発病に関する非遺伝的危険因子であることが知られているライフスタイルや食餌面を変えるなど、予防処置が可能となる。それゆえ、アテローム性動脈硬化症および高コレステロール血症の新規かつ有効な診断法の開発および実際に新規かつ有効な治療が必要とされていることは明らかである。しかし、これらの新規かつ有効な治療は、疾患との関連が立証されている新規かつ有用な遺伝子および／またはタンパク質標的の同定に依存する。アテローム性同役硬化症の治療に有用な化合物を同定するために、これらの標的を単離することがで

き、およびスクリーニング法を開発することができる。

【0004】

本発明は、CCR2レセプターの多型変種がヒトにおけるアテローム性動脈硬化症の発症の低下に関連しているという知見に基づく。本発明により、その変種配列を有するものを含むCCR2レセプターエンコーディングヌクレオチドおよびそれによりコードされるポリペプチドが提供される。そのようなポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、例えば診断アッセイおよびキットに開発に有用である。好ましい具体例では、本発明により、配列番号2のCCR2-64Iポリペプチドまたは配列番号4のCCR2-64Vポリペプチドの対象における発現または活性に関連する、対象におけるアテローム性動脈硬化症またはアテローム性動脈硬化症への罹りやすさを診断する方法であって、(a)該対象のゲノム中のCCR2レセプターをコードしているポリヌクレオチドのコドン64にてのSNPの存在または不在を測定すること、該SNPにより、配列番号2のCCR2-64Iポリペプチドの産生が起こる、および／または、(b)該対象由来のサンプル中の配列番号2のCCR2-64Iポリペプチドまたは配列番号4のCCR2-64Vポリペプチドの存在または不在を分析すること、を含む方法が提供される。

【0005】

さらなる態様において、本発明は、(a)CCR2-64Vポリペプチドまたはそのフラグメント；

(b)CCR2-64Vポリペプチドの活性を阻害する化合物；

(c)CCR2-64Vポリペプチドの二量化を阻害する化合物；

(c)CCR2-64Iポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド：から選択される化合物の、(i)

アテローム性動脈硬化症；または、(ii)高コレステロール血症を治療するための医薬の製造のための使用に関する。

【0006】

疾患の予防または疾患の初期治療は、健康管理機構、健康管理提供者、およびもちろん患者自身のかなり所望される目標である。初期治療の介入により、予防、改良効果が得られ、および／または治療の長さおよびコストが減る。そのような初期の介入には、特定疾患の危険がある患者を正確に同定することが必要である。伝統的には、危険性のある患者は（しばしばいくつかの表現型の異常が明らかになった後で）表現型のパラメータに従い、またはいくつかの場合には疾患症状の病歴を持つ家系のメンバーである場合は遺伝的に同定する。しかし近年、もっと初期の段階で、および表現型または家系の病歴によらずとも危険性のある患者を迅速に同定することが可能となった。必要とされるものは、例えば、次いでゲノタイプし、特定疾患状態に関連することが公知の特定の遺伝的多型を個人が持つかどうかを決定することができる患者の血液サンプルだけである。

【0007】

そのようなゲノタイピングには、遺伝子多型と疾患状態の間の関連性についての知識が必要である。そのような関連性の決定は、現在活発に研究されている分野である。

本明細書に用いられるように、遺伝子多型なる用語は、生物体のDNA配列に自然に生じるバリエーションであって、これにより表現型のバリエーションが生じる可能性があるか、またはその可能性はない。「表現型」は、生物体の組み合わせられた身体的特性と規定してよく、(排他的ではないが)ヒトにおける疾患状態を含む。多型は、2つの広いクラス：単一の塩基置換（単一ヌクレオチド多型またはSNPとしても知られる）、および欠失／挿入；に分けることができる。

【0008】

DNA配列内の特異的ヌクレオチドポジションが研究下にある集団において2またはそれ以上の状態を有する場合、すなわち別個人を比較したときに異なるヌクレオチドが所定のポジションに存在する可能性が

ある場合、SNPが起こる。SNPは遺伝子内部で起こり得る（ここで、「遺伝子」は特定のタンパク質を生じる全コーディングおよび調節領域と規定する）。そのような遺伝子内多型は、遺伝子またはタンパク質の機能に直接影響する可能性があるか、またはその可能性はない。SNPは遺伝子の外部（遺伝子外）にあってもよい。

【0009】

欠失／挿入多型は、他と比較した場合に1個人において1またはそれ以上のヌクレオチドがない場合に生じる。遺伝子分析に用いられる挿入／欠失多型の最も一般的なタイプは、タンデムリピート配列であり、この場合、ゲノム内のDNAの特異的な伸長は、タンデムに繰り返されたモチーフから構成される。そのような配列は、リピート数が多様（多型）であり、別個人においてDNAフラグメントの長さが異なる。タンデムリピート多型は、リピート単位（n）を含むヌクレオチドの数により、2のカテゴリーに分けることができる。2つのクラスは、 $n > 4$ の場合、可変数のタンデムリピート座(variable number of tandem repeat loci) (VNTR) であり、 $n < 5$ の場合、単純なタンデムリピート座(simple tandem repeat loci) (STR) である。両VNTRおよびSTRを、遺伝子関連研究に用いることができる。タンデムリピートは典型的には、遺伝子の外にあるが、遺伝子内にも生じ得る。

【0010】

遺伝子内多型および遺伝子外多型の両方を、表現型に関連する遺伝子の同定に用いることができる。遺伝子内多型は、遺伝子発現のレベルまたは結果的に生じるタンパク質の構造を変更することにより表現型に直接影響を持つ可能性がある。別法として、機能に直接影響を持たない遺伝子内または遺伝子外多型を、機能的に重要な第二の多型と物理的に関連づけて、その機能的変種の知識がなくとも間接的に表現型との関連性を試験してもよい。

【0011】

危険性のある患者の同定のための遺伝的多型の使用に加えて、そのようなゲノタイプの知識を用いて臨床試験研究のための患者のグループを選択し、次いで、そのような試験の結果を解釈することもできる。反応に影響する可能性のある予測因子の適切な情報が研究設計の部分として含まれる場合は、治療剤の効能を検出する臨床試験研究の統計力を本質的に改善することができる。

【0012】

遺伝子多型を臨床試験において予測因子として用いることができる限りにおいて、そのような多型に関する知識およびアッセイにより、これらの研究のいくつかは、よりコスト的に有効なものとなり得る。これは、遺伝的予測因子を含ませることにより、より少数の患者にて、効能を検出するのに等価な統計力に変換される場合に真実であり、こうして所定の研究のコストが下がる。

【0013】

本発明が関する特定のSNPは、単球遊走因子タンパク質、MCP-1のレセプターであるCCR2レセプターをコードしている遺伝子において見出される。MCP-1はCCR2レセプターの二量化による機能反応を誘導する。レセプターホモダイマーの形成は、遊走因子レセプターの特異的リガンド活性化に関連する重要な現象である(PNAS 96: 3628-33(1999))。CCR2ホモダイマー化は、次いでシグナリング経路の活性化のためのJAK（ヤヌス結合チロシンキナーゼ）キナーゼの増幅(recruitment)を誘発すると考えられる(J. Immun. 161: 805-13(1998))。

【0014】

CCR2ポリペプチド中のSNPは、CCR2の第一膜貫通ドメイン内に位置する残基64にてのバリンからイソロイシンへの置換である。本明細書中CCR2-64Iと指定するこの多型変種ポリペプチドのアミノ酸配列を、配列番号2に示す。配列番号2のCCR2-64Iポリペプチドをコードする多型変種が

リヌクレオチドを、配列番号1に示す。つまり、ポジション190にGからAの変換が存在し、これはバリンをコードしているGTCコドンでイソロイシンをコードしているATCコドンに変更する。

【0015】

本明細書中CCR2-64Vと指定する野生型CCR2ポリペプチド配列のアミノ酸配列を配列番号4に示す。CCR2-64Vをコードしているポリヌクレオチドを、配列番号3に示す。

【0016】

CCR2-64I多型は、人種集団に依存して、10-25%の対立遺伝子頻度にて生じる。Mellado et al (1999) Nature 400: 723-24 は、CCR4が野生型CCR2-64Vとでは二量化できないがCCR2-64I変異体と二量化でき、Val64が二量体の安定化に重要である可能性があることを示している。CCR2レセプターが2の別のスプライス形態CCR2aおよびCCR2bを生じることには注意すべきである。配列番号2および配列番号4に示すCCR2ポリペプチド配列は、CCR2b形態である。CCR2aおよびb形態は、残基313まで、および残基313を含んで同一であるが、CCR2a配列は、SLFHIALGCRIAPLQKPVCGGPGVRPGKNVKVTTQGLLDGRGKGKSGRAPEASLQDKEGA-COOH; が 続 き 、 一 方 C C R 2 b は 、 RYLSVFFRKHITKRFCKQCPVFYRETVDGVTSTNTPSTGEQEVSAAGL-COOH が続く。

【0017】

明らかに、アミノ酸残基ポジション64にての多型が両スプライス形態に生じる。本発明はCCR2b形態によってのみ示すが、CCR2ポリペプチドに対する引用は全て、CCR2aおよびCCR2b形態の両方を含む。

多型の影響を、冠動脈心臓障害の家系病歴を持つ個人におけるアテローム性プラークの形成の存在およびその程度および全血漿コレステロールレベルに関して試験した。

すなわち、選択されたヒトの対象グループの研究により、CCR2-I64変異体の存在が、冠動脈石灰沈着(coronary artery calcification) (CAC) の危険性の低さと関連していることが立証された。

【0018】

つまり、第一の態様において、本発明は、配列番号1または配列番号3のポリヌクレオチド、またはそれから誘導されるポリヌクレオチドの、関連するCCR2遺伝子における多型を検出するための診断試薬としての使用に関する。アテローム性動脈硬化症またはアテローム性動脈硬化症への罹りやすさを、cDNAまたはゲノム配列中の配列番号3のポリヌクレオチドにより特徴付けられる、アテローム性動脈硬化症の危険性の増加に関連するCCR2遺伝子のCCR2-64V形態の検出により予測または診断することができる診断ツールが提供される。CCR2遺伝子のCCR2-64I形態の検出により、アテローム性動脈硬化症の危険性の低下を予測する診断法が提供される。これらのCCR2ヌクレオチドの相違を検出するための診断アッセイは、当該分野で周知の種々の方法により行ってもよい。

【0019】

診断のための核酸は、血液、尿、唾液、組織生検または解剖材料から得られてよい。ゲノムDNAを検出のために直接用いてよく、PCR、好ましくはRT-PCR、または他の増幅法を分析前に用いることにより酵素により増幅してもよい。RNAまたはcDNAを同じ様式で用いてよい。欠失および挿入は、正常の遺伝子型との比較において増幅された生成物のサイズの変化により検出することができる。点突然変異は、標識したCCR2-64VまたはCCR2-64Iヌクレオチド配列に対して増幅したDNAをハイブリダイズすることにより同定することができる。完全にマッチした配列は、RNAse消化または融点の違いによりミスマッチの二本鎖から分けることができる。DNA配列の違いは、変性剤を用いて、または用いずに、ゲルにおけるDNAフラグメントの移動度の変化により、または直接DNA配列を決定す

ることにより検出することもできる（例えば、Myers et al., Science(1985) 230: 1242 を参照されたい）。特異的な位置における配列の変化は、RNaseおよびS1プロテクションなどのヌクレアーゼプロテクションアッセイまたは化学分解法により明らかにされてもよい（Cotton et al., Proc Natl Acad Sci USA (1985) 85: 4397-4401 を参照されたい）。

【0020】

ポリペプチドまたはmRNAの発現の異常に低下または増加したレベルの検出を、アテローム性動脈硬化症の患者の罹病性を診断または決定するために用いてもよい。低下または増加した発現は、例えばPCRなどの核酸増幅、RT-PCR、RNaseプロテクション、ノーザンブロットイング、および他のハイブリダイゼーション法などのポリヌクレオチドの定量に関する当該分野で周知の方法のいずれかを用いて、RNAレベルで測定することができる。宿主から誘導されたサンプル中の本発明のポリペプチドなどのタンパク質のレベルを決定するのに用いることができるアッセイ法は、当該分野の専門家に周知である。そのようなアッセイ法には、ラジオイムノアッセイ、競合的結合アッセイ、ウェスタンブロット分析およびELISAアッセイが含まれる。

【0021】

即ち、他の側面において、本発明は、(a) 本発明のポリヌクレオチド、好ましくは配列番号3、配列番号1のヌクレオチド配列、またはそのフラグメントまたはRNA転写産物；

(b) (a) のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列；

(c) 本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号4、配列番号2のポリペプチド、またはそのフラグメント；または、(d) 本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号4または配列番号2のポリペプチドに対する抗体：を含む診断キットに関する。

【0022】

好ましい具体例では、CCR2-64I対立遺伝子に関する診断アッセイには、SNPがヌクレオチド190におけるGからAへの置換である、コドン64にてのSNPの検出が含まれる。

さらなる具体例では、本発明は、配列番号3および配列番号1のポリヌクレオチドの存在または不在をアッセイする方法の、個人においてa) 発病しているアテローム性動脈硬化症の可能性を予測する；

b) アテローム性動脈硬化症の症状の進行を予測し、それに対処する；

c) 薬物治療に対する反応を予測し、それに対処する、または、d) 疾患の結果を予測する；

ための使用に関する。

【0023】

特に好ましい具体例では、薬物治療に対する反応は、アテローム性動脈硬化症の治療に有用な治療用化合物に対する逆の事象である。

さらなる態様において、本発明は、配列番号3および配列番号1のポリヌクレオチドの存在または不在をアッセイする方法の、アテローム性動脈硬化症における使用できる治療用化合物に関する臨床試験を行うための患者のグループの選択のための使用に関する。

【0024】

他の態様では、本発明により、CCR2-64Vポリペプチドの機能を阻害する化合物同定するための、化合物をスクリーニングする方法が提供される。そのような阻害は、a) MCP-1リガンドの結合をブロックする（アンタゴナイズする）ことにより、またはいくつかの他の方法で正常なCCR2-64V刺激性シグナリングをブロックすることにより、例えばアロステリックインヒビターを用いることによりCCR2-64Vレセプターの活性を阻害することにより；または、b) CCR2-64Vシグナリングにおける重要なステップであるCCR2-64Vレセプターの二量体を妨げることにより達成されてよい。

【0025】

一般に、そのようなスクリーニングを用いて同定されるアゴニストまたはアンタゴニストは、アテローム性動脈硬化症などの疾患の治療および予防目的のために用いてよい。化合物は、例えば細胞、セルフリー調製物、化学ライブラリー、および天然産物混合物などの種々の源から同定されてよい。そのように同定されたそのようなアゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターは天然物質または変更された物質、リガンド、レセプター、酵素などであってよく、その構造または機能ミメティクスであってよい (Coligen et al., Current Protocols in Immunology 1(2): Chapter 5 (1991)を参照されたい)。

【0026】

スクリーニング法は、ポリペプチド、またはポリペプチドを有する細胞または膜に対する候補化合物の結合を、単に、直接または間接的に候補化合物と結合した標識を用いて測定してもよい。別法として、スクリーニング法は標識された競争物による競争を含んでよい。さらに、これらのスクリーニング法は、候補化合物がポリペプチドの活性化または阻害により生じるシグナルを生じるかどうかを、ポリペプチドを有する細胞に適した検出システムを用いて試験してよい。活性化のインヒビターは一般に、公知のアゴニストの存在下でアッセイし、候補化合物の存在によるアゴニストによる活性化における影響を観察する。二量化を阻害する場合、スクリーニングは、化合物の、一のCCR2-64Vポリペプチドのもう一つのCCR2-64Vポリペプチドへの結合を阻害する能力を測定することを含んでよい。

【0027】

本質的には、アゴニストまたはインヒビターの不在下で、候補化合物がポリペプチドの活性化の阻害を生じるかどうかを試験することにより逆アゴニストまたはインヒビターをスクリーニングする方法において、活性ポリペプチドを用いてよい。さらに、スクリーニング法は、単に、候補化合物を本発明のポリペプチドを含む溶液と混合して混合液を作成すること、混合液中のCCR2-64V活性を測定すること、次いで混合物のCCR2-64V活性をスタンダードと比較することのステップから成ってよい。融合タンパク質、前記のようにFc部分およびCCR2-64Vポリペプチドから作成されるものなどを、高処理量スクリーニングアッセイに用いて本発明のポリペプチドのアンタゴニストを同定することもできる (例えば、D. Bennett et al., J Mol Recognition, 8: 52-58 (1995); and K. Johanson, et al., J Biol Chem, 270 (16): 9459-9471 (1995)を参照されたい)。

【0028】

ポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび本発明のポリペプチドの対する抗体を用いて、細胞内でのmRNAおよびポリペプチドの産生における添加した化合物の影響を検出するためのスクリーニング法を構成してもよい。例えば、当該分野で公知の常套法によりモノクローナルおよびポリクローナル抗体を用いてポリペプチドの分泌レベルまたは細胞に付随するレベルを測定するためのELISAアッセイを構成してもよい。これは、適当に操作された細胞または組織からのポリペプチドの産生を阻害または高めることができる試薬 (それぞれアンタゴニストまたはアゴニストとも呼ばれる) を発見するのに用いることができる。

【0029】

つまり、一態様において本発明は、(i) 配列番号4のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むポリペプチド、および、(ii) 配列番号4のアミノ酸配列を有するポリペプチドから成る群から選択されるポリペプチドの活性、二量化、またはそのレベルを阻害する化合物を同定するためのスクリーニング法であって、(a) 候補化合物のポリペプチド (またはポリペプチドを発現している細胞または膜) またはその融合タンパク質に対する結合を、候補化合物に直接または間接的に結合する標識を用いて定量的または定性的に測定すること、または検出すること;

(b) 標識された競争物の存在下でのポリペプチド（またはポリペプチドを発現している細胞または膜）またはその融合タンパク質に対する候補化合物の結合の競争を測定すること；

(c) 候補化合物がポリペプチドの活性化または阻害により生じるシグナルを生じるかどうかを、ポリペプチドを発現している細胞または細胞膜に適した検出システムを用いて試験すること；

(d) 候補化合物をポリペプチドを含む溶液と混合して混合液を作成すること、混合物中のポリペプチドの活性を測定すること、および混合物の活性を、候補化合物を含まない対照混合物と比較すること；

(e) 細胞中での該ポリペプチドをコードしているmRNAまたは該ポリペプチドの産生における候補化合物の影響を、例えばELISAアッセイを用いて検出すること：から成る群から選択される方法を含む方法に関する。

【0030】

潜在的ポリペプチドアンタゴニストの例には、場合により、ポリペプチドのリガンド、基質、レセプター、酵素などに近似するオリゴヌクレオチドまたはタンパク質、例えばリガンド、基質、レセプター、酵素などのフラグメント、または反応を誘発しないが本発明のポリペプチドに結合し、その結果、ポリペプチドの活性を妨げる小分子が含まれる。

【0031】

つまり、他の側面において、本発明は、本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、レセプター、物質、酵素など、またはそのようなポリペプチドの産生を減じるまたは高める化合物を同定するためのスクリーニングキットであって、(a) 本発明のポリペプチド；

(b) 本発明のポリペプチドを発現している組換え細胞；

(c) 本発明のポリペプチドを発現している細胞膜；または、(d) 本発明のポリペプチドに対する抗体；ここで、ポリペプチドは好ましくは配列番号4のポリペプチドである、を含むキットに関する。

【0032】

本発明のポリペプチドは、ポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニスト、またはインヒビターの構造に基づく設計のための方法であって、(a) まず、ポリペプチドの三次元構造を決定すること；(b) アゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターのおおよその反応部位または結合部位の三次元構造を導き出すこと；

(c) 導き出された結合部位または反応部位と結合するまたは反応することが予測される候補化合物を合成すること；および、(d) 候補化合物が実際にアゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターであるかどうかを試験すること；

による方法に用いてもよい。

これは通常反復プロセスであることがさらに認識されるであろう。

【0033】

本発明は、本発明の方法のスクリーニング法を用いて同定されるアンタゴニスト化合物、およびアテローム性動脈硬化症の治療のための医薬の製造におけるその使用に関する。本発明は、スクリーニングにおいて同定された化合物の製造方法にも関する。

【0034】

さらなる態様では、本発明により、CCR2-64Vポリペプチド活性の過剰に関連するアテローム性動脈硬化症などの異常な症状を治療する方法が提供される。

【0035】

CCR2-64Vポリペプチドの活性が過剰である場合、数種の手段を利用することができる。一手段は、CCR2-64Vポリペプチドの機能の阻害を必要とする対象に、前記のようなインヒビター化合物（ア

ンタゴニスト)を任意に医薬上許容されるキャリアと組み合わせて、例えばリガンド、相同CCR2-64Vポリペプチド(二量化)、基質、レセプター、酵素などの結合をブロックすることにより、または二次シグナルを阻害することによりCCR2-64Vポリペプチドの機能を阻害し、それにより異常な症状を緩和するのに有効な量で投与することが含まれる。他の手段では、リガンド、物質、酵素、レセプターなどにさらに結合することができる可溶性形態のポリペプチドを、内在性ポリペプチドとの競合において投与してもよい。そのような競争物質の典型例には、CCR2-64Vポリペプチドのフラグメントが含まれる。

【0036】

さらに別の方法では、内在性CCR2-64Vポリペプチドをコードしている遺伝子の発現を、発現ブロック法を用いて阻害することができる。公知のそのような方法には、内部投与または外部投与されるアンチセンス配列の使用が含まれる(例えば、O'Connor, J Neurochem (1991) 56: 560 in Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)を参照されたい)。別法として、遺伝子と三重らせん(「三本鎖」)を形成するオリゴヌクレオチドを供給することができる(例えば、Lee et al., Nucleic Acid Res (1979) 6: 3073; Cooney et al., Science 81988) 241: 456; Dervan et al., Science 81991) 251: 1360を参照されたい)。これらのオリゴマーをそれ自体投与することができ、または関連するオリゴマーをインビボで発現させることができる。合成アンチセンスまたは三本鎖オリゴヌクレオチドは、変更された塩基または変更された骨格を含んでよい。後者の例には、メチルホスホネート、ホトホロチオエートまたはペプチド核酸骨格が含まれる。そのような骨格は、ヌクレアーゼによる分解からの保護を提供するためにアンチセンスまたは三本鎖オリゴヌクレオチドに組み込まれ、かつ当該分野で周知である。これらのまたは他の変更された骨格を用いて合成されたアンチセンスおよび三本鎖部分も、本発明の部分を構成する。

【0037】

加えて、ヒトCCR2-64Vポリペプチドの発現を、ヒトCCR2-64V mRNA配列に特異的なリボザイムを用いて妨げてよい。リボザイムは、天然または合成であり得る触媒活性のあるRNAである(例えば、Usman, N, et al., Curr. Opin. Struct. Biol (1996) 6(4), 527-33を参照されたい)。合成リボザイムを設計して、選択されたポジションでヒトCCR2-64V mRNAを特異的に分解し、それによりヒトCCR2-64V mRNAの機能ポリペプチドへの翻訳を妨げることができる。リボザイムは、RNA分子に通常見られるような通常のリボースフェート骨格および天然塩基を用いて合成されてよい。別法として、リボザイムは非天然骨格、例えば2'-O-メチルRNAを用いて合成されてよく、変更された塩基を含んでもよい。

【0038】

さらなる態様では、本発明により、治療的有效量のポリペプチド、例えば可溶性形態の本発明のポリペプチド、アゴニスト/アンタゴニストペプチドまたは小分子化合物などを医薬上許容されるキャリアまたは賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物が提供される。そのようなキャリアには、制限されるものではないが、塩水、バッファー塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびその組み合わせが含まれる。本発明はさらに、本発明の前記組成物の成分の1またはそれ以上で満たした1またはそれ以上のコンテナを含む医薬パックおよびキットに関する。本発明のポリペプチドおよび他の化合物は、単独で、または治療用化合物などの他の化合物と組み合わせて用いてもよい。

【0039】

組成物は、例えば全身または経口経路による投与の経路に適合させてよい。全身投与の好ましい形態には、注射、典型的には静脈注射によるものが含まれる。他の注射経路、皮下、筋肉内または腹腔内注射を用い

ることができる。合成投与のための別の手段には、胆汁塩またはフシジン酸または他の界面活性剤などの浸透剤を用いる経粘膜および経皮投与が含まれる。加えて、本発明のポリペプチドまたは他の化合物を腸溶製剤またはカプセル製剤に処方することができる場合、経口投与も可能である。これらの化合物の投与は、軟膏、ペースト、ゲルなどの形態の局所用および／または局部用であってもよい。

【0040】

所望される投与範囲は、本発明のペプチドまたは他の化合物、投与経路、製剤の性質、患者の症状の特性、および主治医の判断に依存する。しかし、適当な投与量は、対象の0.1-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲である。しかし、必要とされる投与量に関して広い範囲が、入手可能な化合物の多様性および種々の投与経路の個々の効率の観点から期待される。例えば、経口投与は、静脈注射による投与よりも高投与量を必要とすると考えられる。これらの投与量のレベルに関するバリエーションは、当該分野で周知のように、最適化のための常套の経験的なルーチンを用いて調整することができる。

【0041】

治療に用いるポリペプチドは、対象において、前記のような、「遺伝子治療」と呼ばれることの多い治療様式において体内作成されることもできる。つまり、例えば、対象由来の細胞を、CCR2-64IポリペプチドをコードしているDNAまたはRNAなどのポリヌクレオチドを用いて操作して、CCR2-64Vポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを置きかえてもよく、またはそれに並べて置いてもよい。こうして、全CCR2-64Vポリペプチドの発現が排除され、または有意に低下する。CCR2-64Vポリペプチドのそのような低下した発現は、アテローム性動脈硬化症の発病またはそれに対する罹りやすさに関して治療的に有利である。CCR2-64Iポリペプチドをコードしているそのようなポリヌクレオチドは、レトロウイルスプラスミドベクターの使用によりエキソビボで細胞中に導入することができる。細胞は、次いで対象に導入する。

【0042】

従って、さらなる態様において、本発明により、(a) CCR2-64Vポリペプチドまたはそのフラグメント；

(b) CCR2-64Iポリペプチドまたはそのフラグメント；

(c) CCR2-64Vポリペプチドの活性を阻害する化合物；

(c) CCR2-64Vポリペプチドの二量化を阻害する化合物；

(d) CCR2-64Vポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド；

(e) CCR2-64Iポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドから選択される化合物の、(i)アテローム性動脈硬化症；または、(ii)高コレステロール血症：を治療するための医薬の製造のための使用が提供される。

【0043】

好ましくは、医薬には、配列番号4のCCR2-64Vポリペプチドに対して少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド、最も好ましくは配列番号4の単離ポリペプチドを含む単離ポリペプチドが含まれる。他の具体例では、医薬には、配列番号2のCCR2-64Iポリペプチドと少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド、好ましくは配列番号2のポリペプチドを含む単離ポリペプチドが含まれる。

【0044】

さらなる具体例では、医薬には、溶解形態のCCR2-64Vポリペプチドが含まれる。

いっそうさらなる具体例では、医薬には、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、好ましくは配列番号1のポリヌクレオチドと少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチド、最も好ましくは配列番号1のポリヌクレオチドが含まれる。

る。

【0045】

そのようなスクリーニングには、CCR2-64VおよびCCR2-64Iポリペプチドおよびポリヌクレオチドが必要である。本発明のCCR2-64VおよびCCR2-64Iポリヌクレオチドは、常套のクローニングおよびスクリーニング法を用いて、組織の細胞中のmRNAから誘導されたcDNAライブラリーから得てよい(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)を参照されたい)。本発明のポリヌクレオチドは、ゲノムDNAライブラリーなどの天然の源から得てもよく、または周知かつ一般に利用可能な方法を用いて合成することができる。

【0046】

配列番号1のポリヌクレオチド配列は、配列番号2のCCR2-64IポリペプチドをコードするcDNA配列である。配列番号2のポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド配列は、配列番号1の配列をコードしているポリペプチドと同一であってよく、または遺伝子コードの重複(縮重)の結果として配列番号2のポリペプチドもコードする配列番号1以外の配列であってよい。

【0047】

配列番号3のポリヌクレオチド配列は、配列番号4のCCR2-64VポリペプチドをコードするcDNA配列である。配列番号4のポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド配列は、配列番号3の配列をコードしているポリペプチドと同一であってよく、または遺伝子コードの重複(縮重)の結果として配列番号4のポリペプチドもコードする配列番号3以外の配列であってよい。

【0048】

本発明のポリヌクレオチドを本発明のポリペプチドの組換え産生のために用いる場合、ポリヌクレオチドは成熟ポリペプチドそのもののコーディング配列またはリーディングフレーム中に他のコーディング配列、リーダーまたは分泌配列、プレ、またはプロまたはプレプロタンパク質配列、または他の融合ペプチド部分をコードしているものなどを有する成熟ポリペプチドのコーディング配列を含んでよい。例えば、融合ポリペプチドの精製を促進するマーカー配列をコードすることができる。本発明のこの側面の所定の好ましい具体例において、マーカー配列はpQEベクター(Qiagen, Inc.)中に提供され、および Gentz et al., Proc Natl Acad Sci USA (1989) 86: 821-824 に開示されるようなヘキサ-ヒスチジンペプチドであり、またはHAタグである。ポリヌクレオチドは、転写、非翻訳配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位およびmRNAを安定化する配列などを含む非コーディング5'および3'配列を含んでもよい。

【0049】

本発明の組換えポリペプチドは、当該分野で周知の方法により、発現系を含む遺伝子操作された宿主細胞から調製してよい。従って、さらなる態様において、本発明は本発明のポリヌクレオチドを含む発現系、そのような発現系を用いて遺伝子操作された宿主細胞、および本発明のポリペプチドの組換え法による産生に関する。セルフリーの翻訳系を、本発明のDNA構築物から誘導されるRNAを用いて、そのようなタンパク質を製造するために用いることもできる。

【0050】

組換え産生に関して、宿主細胞を遺伝子操作して、本発明のヌクレオチドのための発現系またはその部分を組み込むことができる。ポリヌクレオチドは、宿主細胞に、多くの通常の研究マニュアル、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology(1986)および Sambrook et al.(既出)などに記載の方法により導入してよい。好ましいポリヌクレオチドの宿主細胞への導入法には、例えば、リン酸カルシウムトランスフェ

クション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション、マクロインジェクション、カチオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、スクレエプローディング、パリスティック導入またはインフェクションなどが含まれる。

【0051】

適当な宿主の典型例には、細菌細胞、例えば、ストレプトコッカ(*Streptococci*)、スタフィロコッカ(*Staphylococci*)、イー.コリ、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)およびバシラスサブチリス(*Bacillus subtilis*)細胞など;真菌細胞、例えば酵母細胞およびアスペルギルス(*Aspergillus*)細胞;昆虫細胞、例えばドロソフィラ(*Drosophila*) S 2 およびスポドプテラ(*Spodoptera*) S f 9 細胞;動物細胞、例えば、CHO、COS、ヒーラー、C 1 2 7、3 T 3、BHK、HEK 2 9 3 およびB o w e sメラノーマ細胞;および植物細胞などが含まれる。

【0052】

非常に様々な発現系、例えば染色体系、エピソーム系およびウイルス由来の系、例えば細菌プラスミド由来のベクター、バクテリオファージ由来のベクター、トランスポゾン由来のベクター、酵母エピソーム由来のベクター、挿入エレメント由来のベクター、酵母染色体エレメント由来のベクター、バキュロウイルス、パポバウイルスなどのウイルス、SV 4 0、ワシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、偽狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスなどのウイルス由来のベクター、およびそれらの組み合わせ由来のベクター、例えばプラスミドとバクテリオファージ遺伝子エレメント由来のベクター、コスミドおよびファージミドなどを用いることができる。発現系は、発現を調節する、ならびに発生させるコントロール領域を含んでよい。一般に、ポリヌクレオチドを維持、増幅、または発現して宿主中でポリペプチドを産生することができるあらゆる系またはベクターを用いてよい。適当なポリヌクレオチド配列を、周知かつ通常の種々の方法のいずれか、例えば Sambrook et al., (既出) に記載されているものなどを用いて発現系に挿入してよい。適当な分泌シグナルを所望のポリペプチドに組み込んで、翻訳されたタンパク質の小胞体の内腔、ペリプラズム空間、または細胞外環境への分泌を可能とすることもできる。

【0053】

本発明のポリペプチドをスクリーニングアッセイにおける使用のために発現させる場合、ポリペプチドは細胞の表面で産生されることが一般に好ましい。この場合、細胞はスクリーニングアッセイにおける使用の前に回収してよい。ポリペプチドが培地中に分泌される場合、ポリペプチドを回収および精製するために培地を回収することができる。細胞内で産生する場合、ポリペプチドを回収する前に、細胞をまず溶解しなければならない。

【0054】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法により組換え細胞培養物から回収および精製することができる。最も好ましくは、高処理量液体クロマトグラフィーを精製に用いる。細胞内合成、単離および/または精製中にポリペプチドが変性した場合、タンパク質を再度折りたたむための周知の技術を用いて、活性形態を再度作成してよい。

【0055】

本発明を、以下の実施例によりここに示す。

実施例実施例1-ヒトの対象および研究設計 合週国からの428のカフカス人、176人の女性および252人の男性をEBCTおよび血漿cLDL、トリグリセリドおよびHDLを用いて冠動脈石灰化(CA

C) に関して試験した。冠動脈心疾患（早発性CHDに関して少なくとも第一段階）の家族歴を持ち、かつ共通の危険因子を持たないヒトを選択した。アクティブスモーカー非制御性高血圧症、肥満、糖尿病および高コレステロール血症の人は全て除外した。アテローム性動脈硬化症を測定するための方法、電子ビームコンピューター断層撮影（EBCT）は、感光性の、冠動脈石灰化に関する特殊な方法であり、アテローム性プラークのサイズの非浸襲性の定量化に有益である(Circulation 93: 1951-53 (1996), Mayo Clin. Proc 71: 369-77 (1996))。

【0056】

結果 CACを有する対象と、有しない対象の間の遺伝子型頻度を（20のEBCTスコアを境界として用いて）比較した（表1）。

【0057】

【表1】

CCR2B遺伝子変種の遺伝子頻度およびCAC

【0058】

実際、CCR2I64変異体の存在が、CACのより低いリスクと関連していることが明らかになった。男性および女性の両方で傾向は同じであったが、結果は、男性の間でのみ統計学的に有意であった（ $p < 0.03$ ）。

【0059】

EBCTスコア >0 を有する対象において、CACの程度におけるCCR2遺伝子型の影響を試験した。アミノ酸残基CCR264を、年齢、性およびBMIを共変量として用いて分析し、それはEBCTスコアと有意な関連性を示した（ $p < 0.005$ 、示していない）。CCR2-I64変異体を持つ女性は、Valキャリアよりも平均30%EBCTスコアが低かった。男性では、違いは平均17%であった。これは、CCR2-I64キャリアにおいてMCP-1誘導性シグナル伝達が低いこと、およびそれゆえ単球の増幅が少ないという事実と一致する。

【0060】

cLDLの血漿レベルにおける、CCR2I64変種の有意な影響がヒトにおいて見出された（ $p < 0.05$ ）。HDLのレベルにもトリグリセリドのレベルにも、影響は認められなかった（示していない）。Hanおよび共働者（ATVB 18: 983-91 (1998))は、単球におけるCCR2の発現がLDLにより大きく影響を受け、かつ高コレステロール血症患者から単離された単球がCCR2の発現の2倍増を示すことを明らかにしている(J Lipid Res 40: 1053-63 (1999))。LDLはCCR2の発現を増す一方、HDLはCCR2単球の発現の阻害を導く。我々の結果は、CCR2によるシグナル伝達を感知し、そして血漿コレステロールに影響を持つフィードバック調節機構の潜在的な存在を示唆する。もしこれが事実なら、CCR2アゴニストがLDL血漿レベルを調節することも考えられる。結論として、本研究により、ヒトにおけるCCR2B遺伝子の変異（低シグナル伝達に関連すると考えられる）が、1. アテローム性プラークの発生の危険性を下げる、2. 冠動脈疾患が存在するプラークの量を減らす、3. LDLコレステロールの血漿レベルを下げることを示された。

【0061】

実施例2—ゲノタイピングゲノタイピング：CCR2V64I多型のための対立遺伝子特異的増幅プライマーを、共通のフォワードオリゴと組み合わせて用いた。2のPCRを各DNAサンプルにつき（各対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドに関して一つ）に関して、以下の条件：94℃にて40秒間、60℃

にて30秒間、各プライマーの10 pモル、1 UのTaq Express (GenPak Ltd.)、50 mMのトリスHCl pH9.1、16 mMの硫酸アンモニウム、3.5 mMのMgCl₂、150 μg/ml牛血清アルブミン、さらに25-100 ngのDNAを含む20 μlの反応液中35サイクルを用いて行った。各DNAに関して、2のASA反応を3%アガロースゲル上で独立に行い、各レーンを各対立遺伝子の存在および不在に関してスコアした。用いた対立遺伝子特異的オリゴは CCR2V64IRC: 5' TTG CAG TTT ATT AAG ATG CGG AC、CCR2V64IRT: 5' TTG CAG TTT ATT AAG ATG CGG AT、共通のフォーワードオリゴ: CCR2V64IF: 5' TAC CAA CGA GAG CGG TGA AGA AGT であった。

【0062】

配	列	情	報	配	列	番	号
ATGCTGTCCACATCTCGTTCTCGGTTTATCAGAAATACCAACGAGAGCGGTGAAGAAGTCACCAC							1
CTTTTTTGATTATGATTACGGTGCTCCCTGTCATAAATTTGACGTGAAGCAAATTGGGGCCCAACT							
CCTGCCTCCGCTCTACTCGCTGGTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCAT							
CTTAATAAACTGCAAAAAGCTGAAGTGCTTGACTGACATTTACCTGCTCAACCTGGCCATCTCTGA							
TCTGCTTTTTCTTATTACTCTCCCATTTGTGGGCTCACTCTGCTGCAAATGAGTGGGTCTTTGGGAA							
TGCAATGTGCAAATTATTCACAGGGCTGTATCACATCGGTTATTTTGGCGGAATCTTCTTCATCATC							
CTCCTGACAATCGATAGATACCTGGCTATTGTCCATGCTGTGTTTGCTTTAAAAGCCAGGACGGTC							
ACCTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACCTGGTTGGTGGCTGTGTTTGCTTCTGTCCCAGGAAT							
CATCTTTACTAAATGCCAGAAAGAAGATTCTGTTTATGTCTGTGGCCCTTATTTTCCACGAGGATG							
GAATAATTTCCACACAATAATGAGGAACATTTTGGGGCTGGTCCTGCCGCTGCTCATCATGGTCAT							
CTGCTACTCGGGAATCCTGAAAACCCTGCTTCGGTGTCGAAACGAGAAGAAGAGGCATAGGGCA							
GTGAGAGTCATCTTCACCATCATGATTGTTTACTTTCTCTTCTGGACTCCCTATAACATTGTCATTC							
TCCTGAACACCTTCCAGGAATTCTTCGGCCTGAGTAACTGTGAAAGCACCAGTCAACTGGACCAA							
GCCACGCAGGTGACAGAGACTCTTGGGATGACTCACTGCTGCATCAATCCCATCATCTATGCCTT							
CGTTGGGGAGAAGTTCAGAAGGTATCTCTCGGTGTTCTTCCGAAAGCACATCACCAAGCGCTTCT							
GCAAACAATGTCCAGTTTTCTACAGGGAGACAGTGGATGGAGTGACTTCAACAAACACGCCTTCC							
ACTGGGGAGCAGGAAGTCTCGGCTGGTTTATAA							【0063】

配	列	番	号
MLSTSRSRFIRNTNESGEEVTTFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVILILI			2
NCKKLKCLTDIYLLNLAISDLLFLITLPLWAHSAANEWVFGNAMCKLFTGLYHIGYFGGIFFIILLTI			
DRYLAIVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWLVAVFASVPGIIFTKCQKEDSVYVCGPYFPRGWNNFHTI			
MRNILGLVLP LLIMVICYSGILKTLLRCRNEKKRHRARVIFTIMIVYFLFWTPYNIVILLNTFQEFFF			
LSNCESTS QLDQATQVTETLGMTHCCINPIIYAFVGEKFRRYLSVFFRKHITKRFCQCPVFYRETV			
DGVTSTNTPSTGEQEV SAGL			【0064】

配	列	番	号
ATGCTGTCCACATCTCGTTCTCGGTTTATCAGAAATACCAACGAGAGCGGTGAAGAAGTCACCAC			3
CTTTTTTGATTATGATTACGGTGCTCCCTGTCATAAATTTGACGTGAAGCAAATTGGGGCCCAACT			
CCTGCCTCCGCTCTACTCGCTGGTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGGCAACATGCTGGTCGTCCTCAT			
CTTAATAAACTGCAAAAAGCTGAAGTGCTTGACTGACATTTACCTGCTCAACCTGGCCATCTCTGA			
TCTGCTTTTTCTTATTACTCTCCCATTTGTGGGCTCACTCTGCTGCAAATGAGTGGGTCTTTGGGAA			
TGCAATGTGCAAATTATTCACAGGGCTGTATCACATCGGTTATTTTGGCGGAATCTTCTTCATCATC			
CTCCTGACAATCGATAGATACCTGGCTATTGTCCATGCTGTGTTTGCTTTAAAAGCCAGGACGGTC			

ACCTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACCTGGTTGGTGGCTGTGTTTGCTTCTGTCCCAGGAAT
CATCTTTACTAAATGCCAGAAAGAAGATTCTGTTTATGTCTGTGGCCCTTATTTTCCACGAGGATG
GAATAATTTCCACACAATAATGAGGAACATTTTGGGGCTGGTCCTGCCGCTGCTCATCATGGTCAT
CTGCTACTCGGGAATCCTGAAAACCCTGCTTCGGTGTGCGAAACGAGAAGAAGAGGCATAGGGCA
GTGAGAGTCATCTTCACCATCATGATTGTTTACTTTCTCTTCTGGACTCCCTATAACATTGTCATT
TCCTGAACACCTTCCAGGAATTCTTCGGCCTGAGTAACTGTGAAAGCACCAGTCAACTGGACCAA
GCCACGCAGGTGACAGAGACTCTTGGGATGACTCACTGCTGCATCAATCCCATCATCTATGCCTT
CGTTGGGGAGAAGTTCAGAAGGTATCTCTCGGTGTTCTTCCGAAAGCACATCACCAAGCGCTTCT
GCAAACAATGTCCAGTTTTCTACAGGGAGACAGTGGATGGAGTGACTTCAACAAACACGCCTTCC
ACTGGGGAGCAGGAAGTCTCGGCTGGTTTATAA 【0065】

配	列	番	号	4
---	---	---	---	---

MLSTSRSRFIRNTNESGEEVTTFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVVLILI
NCKKLKCLTDIYLLNLAISDLLFLITLPLWAHSAANEWVFGNAMCKLFTGLYHIGYFGGIFFIILLTI
DRYLAIHVHAFALKARTVTFGVVTSVITWLVAVFASVPGIIFTKCQKEDSVYVCGPYFPRGWNNFHTI
MRNILGLVLPLLIMVICYSGILKTLLRCRNEKKRHRAVRVIFTIMIVYFLFWTPYNIVILLNTFQEFFG
LSNCESTSQLDQATQVTETLGMTHCCINPIIYAFVGEKFRRYLSVFFRKHITKRFCKQCPVFYRETV
DGVSTSTNTPSTGEQEVSAGL 【配列表】